

Title	Rolling of Th1 Cells Via PSGL-1 Stimulates LFA-1-Mediated Cell Binding to ICAM-1
Author(s)	新, 和之
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45433">https://hdl.handle.net/11094/45433</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	あたらし 新 かず 和 ゆき 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 9 3 4 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学 位 論 文 名	Rolling of Th1 Cells Via PSGL-1 Stimulates LFA-1-Mediated Cell Binding to ICAM-1 (PSGL-1 を介した Th1 細胞のローリングは LFA-1 を介した ICAM-1 への細胞接着を誘導する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 宮坂 昌之  (副査) 教 授 平野 俊夫 教 授 菊谷 仁

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

炎症局所において、白血球はまずセレクトインとそのリガンドを介して血管内皮細胞上をローリングし、次に血管内皮細胞上に提示されたケモカインの刺激を受けてインテグリンが活性化されることにより血管内皮細胞に強固に接着し、組織に浸潤する。PSGL-1 は白血球広範に発現する P-セレクトインの主要なリガンドであり、骨髓球系の細胞や Th1 細胞など一部のリンパ球サブセットのローリングを媒介する。私は、ローリングを媒介する分子が細胞内にシグナルを伝達するか明らかにするため、マウス Th1 細胞を用い、PSGL-1 を可溶型の抗体で架橋することにより、もしくは固相化した P-セレクトイン上をローリングさせることにより、LFA-1 が活性化されるか検討した。さらに PSGL-1 を架橋することにより、どのようなシグナル伝達分子が活性化されるか検討した。

#### 【方法ならびに成績】

Th1 細胞は、C57BL/6 マウス脾臓より分離した CD4 T 細胞を *in vitro* で分化させて得た。Th1 細胞の PSGL-1 を抗 PSGL-1 モノクローナル抗体 (2PH1) および二次抗体により架橋し、静止条件下における ICAM-1 への接着を検討した。その結果、二次抗体依存的に ICAM-1-IgG キメラタンパク質 (ICAM-1-IgG) への接着細胞数が約 10 倍増加した。接着細胞数の増加は抗 LFA-1 抗体により阻害されたことから、LFA-1 を介することが明らかとなった。さらに PSGL-1 の架橋がフロー条件下における ICAM-1 との接着に影響するか検討した結果、接着細胞数・ずり応力抵抗性ともに増強した。また、静止条件下において PSGL-1 の架橋と炎症性ケモカイン CXCL10 または CCL5 との共刺激をすると、短時間の PSGL-1 架橋により ICAM-1 への接着性が 70%増強し、さらにケモカインを加えることにより 175%に増強した。インテグリンの活性化には 2 つの機構が報告されている。一つはインテグリンの立体構造の変化による affinity の上昇による活性化、もう一方はインテグリンの凝集による avidity の上昇による活性化である。まず、PSGL-1 の架橋が LFA-1 の affinity に影響するか、可溶型 ICAM-1-IgG を用いたフローサイトメトリーにより検討した。その結果、PSGL-1 の架橋では ICAM-1-IgG の結合が検出されなかったことから、LFA-1 の affinity には大きな影響を与えないことが明らかになった。次に、PSGL-1 の架橋が LFA-1 の avidity に影響するか調べるため、

共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて細胞表面上の分子の局在を解析した。その結果、PSGL-1 の架橋は細胞表面上における LFA-1 の凝集を誘導し、CXCL10 または CCL5 との共刺激でさらに凝集が亢進した。これらの結果より、PSGL-1 の架橋は LFA-1 の avidity を上昇させることが示唆された。さらに、Th1 細胞が P-セレクトリン上をローリングすると ICAM-1 への接着性が変化するか調べるため、P-セレクトリン-IgG キメラタンパク質を固相化した微小ガラス管と ICAM-1-IgG を固相化した微小ガラス管を直列につなぎ、フロー条件下における ICAM-1 への接着を解析した。その結果、P-セレクトリン上をローリングした Th1 細胞は ICAM-1 への接着がローリングしない時と比べ約 6 倍増強し、接着亢進は PSGL-1 に対する阻害抗体で抑制された。これらの結果より、PSGL-1 を介したローリングにより、ICAM-1 への接着が亢進することが示された。最後に PSGL-1 を介した LFA-1 の活性化に関与するシグナル伝達分子を解析した。PSGL-1 の架橋や PSGL-1 を介するローリングによる ICAM-1 への接着亢進は、プロテインキナーゼ C (PKC) 阻害剤により抑制された。また、PSGL-1 の架橋により PKC $\alpha/\beta$  II のリン酸化の亢進がウエスタンブロット法により検出された。これらの結果より、PSGL-1 を介した刺激が PKC を活性化し、LFA-1 を介する接着を活性化することが示唆された。

#### 【総括】

抗体による PSGL-1 の架橋、または PSGL-1 を介したローリングは Th1 細胞の LFA-1 を活性化して ICAM-1 への接着亢進を誘導した。さらに PSGL-1 からの刺激は、ケモカインの刺激と協調的に働き LFA-1 を活性化することが示された。また、PSGL-1 を介したローリングにより惹起される LFA-1 活性化には PKC が関与することが明らかになった。PSGL-1 を介した LFA-1 活性化におけるシグナル伝達経路の解明は、炎症性疾患における白血球浸潤の制御に寄与するものと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

好中球や Th1 細胞などの白血球表面に発現する PSGL-1 は炎症局所の血管内皮細胞に発現誘導される P-selectin や E-selectin と結合し、白血球のローリングを媒介する。白血球の血管外遊走の過程において、白血球は血管内皮細胞上に提示されたケモカインにより刺激を受け、インテグリンを活性化することで血管内皮細胞に強固に接着し浸潤する。演者は Th1 細胞に発現する PSGL-1 を介したローリングによる刺激がインテグリンの活性化にどのように関与するか検討した。Th1 細胞の PSGL-1 を刺激すると、LFA-1 の細胞表面での凝集を促進し、静止条件下において Th1 細胞の ICAM-1 に対する接着性を亢進した。さらにフロー条件下において、Th1 細胞が PSGL-1 を介して P-selectin 上をローリングすることで、LFA-1 を活性化し ICAM-1 に対する接着性を亢進した。これらのことから、Th1 細胞の炎症局所への浸潤過程において、PSGL-1 を介したローリングも LFA-1 を活性化し、標的組織への浸潤に関与することが示され、学位の授与に値すると思われる。